

Isolamento biomonitorado de alcalóides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba)

Tabosa, I.M.¹; Quintans-Júnior, L.J.²; Pamplona, F.V.²; Almeida, R.N.²; Cunha, E.V.L. da²;
Silva, M.S. da²; Souza, J.C. de A.³;
Barbosa Filho, J.M.^{2*}

¹Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal da Paraíba;

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba;

³Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO: Uma investigação fitoquímica das vagens de *Prosopis juliflora* cultivada na região semi-árida do Estado da Paraíba e monitorada através de testes farmacológicos levou ao isolamento, purificação e identificação do alcalóide principal juliprosopina. A presença de outros constituintes químicos em mistura, tais como juliprosina e juliprosineno, foi verificada na fração dos alcalóides totais através de uma análise do espectro de RMN de ¹³C. Este trabalho sugere que a toxicidade, observada em animais de laboratório, está quimicamente relacionada com os alcalóides piperidínicos presentes nas vagens desta leguminosa.

Unitermo: *Prosopis juliflora*, Leguminosae, algaroba, alcalóides piperidínicos, juliprosopina, juliprosina, juliprosineno, toxicidade.

ABSTRACT: A phytochemical investigation of the pods of *Prosopis juliflora* cultivated in the semi arid region of the State of Paraíba, monitored by pharmacological tests, led to the isolation, purification and identification of its main alkaloid – juliprosopine. The presence of other compounds such as juliprosine and juliprosinene, was observed through analysis of ¹³C NMR. This work suggests that the toxic activity, observed in laboratory animals, is chemically related with the piperidine alkaloids present in the pods of this Leguminosae.

Key words: *Prosopis juliflora*, Leguminosae, algaroba, piperidine alkaloids, juliprosopine, juliprosine, juliprosinene, toxic activity.

INTRODUÇÃO

Prosopis juliflora A. DC., conhecida vulgarmente como algarobeira ou algaroba, é um arbusto da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae. O gênero *Prosopis* possui 44 espécies, distribuídas nas regiões áridas e semi-áridas do continente americano, do norte da África e do leste da Ásia. Desta planta foram isolados anteriormente lipídios (El-Sakhawy et al., 1991), carboidratos (El-Sakhawy et al., 1991), aminoácidos (Carman et al., 1974; Ebeid, 1983), flavonóides (Shukla et al., 1980; Shukla e Misra, 1981; Vajpeyi e Misra, 1981; Malhotra e Misra, 1983a,b), terpenóides (Ahmad e Sultana, 1989; El-Sakhawy et al., 1991), taninos (Malhotra e Misra, 1981a,b; Malhotra e Misra, 1983b,c) e alcalóides (Smith, 1977; Ahmad et al., 1978; Ott-Longoni et al., 1980; Datwyler et al., 1981; Ahmad et al., 1989a; Ahmad et al., 1991).

Estima-se que existam no momento cerca de 150 mil hectares da região Nordeste do Brasil ocupados pela algarobeira, principalmente na região semi-árida. Os frutos da algarobeira são vagens que apresentam alto valor nutricional, são palatáveis e muito apreciadas pelos bovinos,

caprinos, ovinos, eqüinos e outros animais; estes frutos são também consumidos pelas populações humanas na forma de bolos, pães, biscoitos, doces, geléias e aguardente no Peru, Chile, Argentina e Brasil (Mendes, 1985). Esta leguminosa é reconhecidamente importante para o Polígono das Secas (região do Nordeste até o Norte de Minas Gerais onde os índices pluviométricos oscilam em média entre 500 e 700 mm anual), por sua alta resistência à estiagem prolongada, ao calor e aos solos pobres, que mesmo nestas condições produzem vagens em todos os meses do ano, sendo sua maior produção no período seco, estando a carga máxima concentrada nos meses de setembro, outubro e novembro (Silva, 1989). No Brasil, especificamente na região de Cruzetá no Estado do Rio Grande do Norte e na região de Patos no Estado da Paraíba, tem-se verificado que bovinos desenvolvem uma doença chamada "Cara-Torta" quando são mantidos com uma dieta alimentar desbalanceada, constituída principalmente dos frutos da algarobeira durante períodos longos. A sintomatologia é caracterizada clinicamente por emagrecimento acentuado, dificuldade de mastigação, salivação abundante, desvio lateral da cabeça, protusão da língua e finalmente a morte (Dantas e Menezes, 1994). Diante desta problemática, o Centro de Saúde e Tecnologia Rural e o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB juntamente com o Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG desenvolveram um projeto piloto com caprinos, reproduzindo experimentalmente alguns sinais clínicos desta enfermidade. Estes sinais, resultaram, principalmente, em lesões degenerativas neuronais do núcleo motor do trigêmio, e, ocasionalmente, do núcleo oculomotor. Estas lesões foram caracterizadas por uma fina e espumosa vacuolização do pericário neuronal. A partir desses achados, hipotetiza-se que esta enfermidade seja causada pela ingestão de vagens de algarobeira, possuidora de um fator determinante/predisponente de ordem tóxica e/ou metabólica (Tabosa et al., 2000).

A enfermidade espontânea dos bovinos, como também a utilização da vagem de algaroba na alimentação humana, torna este estudo importante. O presente trabalho é a primeira tentativa de isolar e identificar os prováveis constituintes químicos responsáveis pelas atividades tóxicas descritas acima, *in vivo*, utilizando camundongos albinos suíços.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Vagens de *Prosopis juliflora* A. DC foram coletadas nos meses de janeiro a março de 1997 no município de Patos – PB. Uma exsiccata do material encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Básicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob o registro BHCB 43784. As vagens foram desidratadas em estufa com ar circulante, a 38 °C, por 72 horas, e trituradas em moinho tipo Harley.

Para a determinação estrutural foram utilizados os aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear das marcas BRUKER AC 200 da Universidade Federal do Ceará e JEOL 270 da Universidade de Strathclyde, Glasgow, Reino Unido.

Para o estudo farmacológico utilizou-se camundongos suíços, machos, albinos (*Mus musculus*) com peso entre 25 e 35 gramas, e aproximadamente três meses de idade. Todos foram agrupados em gaiolas de polietileno, contendo cinco animais em cada, mantidos sob condições controladas de temperatura de 27 ± 2 °C, tendo livre acesso a água e comida (tipo *pellets* de ração da marca comercial Purina). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, onde a fase clara foi das 6 -18 horas.

Metodologia de extração, isolamento e purificação dos alcalóides de *Prosopis juliflora*

Após a realização de uma triagem fitoquímica preliminar (Barbosa Filho et al., 1984) constatou-se a presença de alcalóides nas vagens da algarobeira através da positividade com os reagentes de Dragendorff, Mayer, Bouchardat e Bertrand. Procedeu-se uma marcha sistemática, com monitoramento da atividade tóxica, para extração desta classe de substâncias.

Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

Vagens secas e trituradas, pesando 20 kg, foram maceradas com etanol a 95%, temperatura ambiente, por 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e submetido a uma nova extração por igual período. As soluções extrativas, após serem reunidas e concentradas a vácuo a uma temperatura em torno de 50 °C, forneceram um resíduo viscoso castanho-escuro, pesando 2 kg denominado Extrato Etanólico Bruto (EEB).

Obtenção da Fração dos Alcalóides Totais (FAT)

O EEB foi tratado com uma solução de ácido clorídrico a 3% sob agitação mecânica e filtrado em celite, fornecendo uma parte insolúvel que foi descartada por não apresentar positividade para o teste de alcalóides nem qualquer atividade tóxica, e uma solução aquosa ácida que foi extraída várias vezes com clorofórmio. A fase clorofórmica, depois de seca com sulfato de sódio anidro e evaporada, forneceu um resíduo oleoso, pesando 12 g. Esse material, denominado de fração clorofórmica obtida em pH ácido, foi descartado por não apresentar teste positivo para alcalóides nem atividade tóxica. A fase aquosa ácida desengordurada foi alcalinizada, a frio, com uma solução de hidróxido de amônia até pH 8 e re-extraída com clorofórmio até apresentar reação negativa com o reagente de Dragendorff. A fase clorofórmica obtida em pH alcalino, depois de seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada a vácuo foi denominada de Fração dos Alcalóides Totais (FAT), pesando 5 g.

Isolamento do alcalóide principal Juliprosopina

Uma análise cromatográfica preliminar da FAT, utilizando cromatofolhas de gel de sílica 60 F₂₅₄ em alumínio (Merck), no sistema de eluentes clorofórmio:metanol:dietilamina (90:10:1), utilizando o reagente de Dragendorff como revelador, mostrou a presença de cinco alcalóides. Um deles, com R_f = 0,6, pelo tamanho da mancha, dava indicação de que se tratava provavelmente do componente principal.

Todas as tentativas de purificação da FAT através de cromatografia em coluna de gel de sílica ou óxido de alumínio mostraram-se infrutíferas, pois o material, muito sensível, se degradava rapidamente. Assim sendo, FAT foi aplicada diretamente sobre placas de vidro preparativas 20 x 20 de gel de sílica 60 PF₂₅₄ (Merck) e eluída com uma mistura de clorofórmio:metanol:dietilamina (90:10:1), resultando no isolamento de cinco frações semi-purificadas, codificadas de PJ-1 a PJ-5. Apenas uma delas foi obtida em quantidade suficiente e submetida a uma nova purificação através de cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o mesmo sistema de eluente. Esta substância pura (PJ-3; 0,78 g; 0,0039%) foi posteriormente identificada através de RMN de ¹H e ¹³C como sendo o alcalóide de núcleo piperidínico, juliprosopina, que mostrou atividade tóxica.

Uma análise direta do espectro de RMN de ¹³C-APT da Fração dos Alcalóides Totais mostrou que além de juliprosopina pelo menos dois outros alcalóides também estavam presentes naquela mistura, juliprosina e juliprosineno.

Dados espectroscópicos de juliprosopina

RMN ¹H (270 MHz, C₅D₅N, d): 5,6 (1H, s, H-7'''), 3,8 (2H, sl, H-3 e 3'), 3,4 (1H, d, J=16 Hz, Heq-5'''), 3,2 (1H, t, J=8 Hz, H-3'''), 3,0 (2H, m, H-2 e 2'), 2,9 (2H, m, H-6 e 6'), 2,7 (1H, d, J=16 Hz, Hax-5'''), 1,4 (6H, d, J=7 Hz, H-7 e 7').

RMN ¹³C (67,5 MHz, C₅D₅N, d): 137,3 (C-6'''), 124,9 (C-7'''), 67,5 (C-3 e 3'), 66,4 (C-8a'''), 57,7 (C-2 e 2'), 56,7 (C-6 e 6'), 56,2 (C-5'''), 55,3 (C-3'''), 43,6 (C-8'''), 37,2 (C-1'' e 1'''), 36,0 (C-10''), 34,0 (C-1'''), 33,1 (C-4 e 4'), 31,0-30,0 (C-3'', 3''', 4'', 4''', 5'', 5''', 6'', 6''', 7'', 7''', 8'' e 8'''), 28,9 (C-10'''), 27,2 (C-5 e 5'), 26,7 (C-9'' e 9'''), 26,4 (C-2'' e 2'''), 22,4 (C-2''''), 19,0 (C-7 e 7').

Dados do espectro de RMN ¹³C (APT) da Fração dos Alcalóides Totais (FAT)

RMN ¹³C-APT (200 MHz, C₅D₅N, d): 178,28 (p), 160,3 (p), 157,53 (p), 154,94 (p), 152,29 (n), 145,86 (n), 144,42 (n), 141,68 (p), 140,52 (n), 139,20 (p), 138,69 (n), 136,73 (p), 131,15 (n), 130,93 (n), 130,50 (n), 130,19 (n), 129,65 (n), 129,14 (n), 128,46, 128,08 (n), 126,51 (n), 124,38 (n), 121,75 (n), 121,25 (n), 120,54 (n), 119,95 (n), 119,62 (n), 118,98 (n), 118,18 (n), 117,79 (n), 116,35 (n), 116,29 (n), 115,98 (n), 113,67 (n), 112,60 (n), 112,43 (n), 111,97 (n), 111,54 (n), 110,78 (n), 109,28 (n), 104,89 (n), 104,80 (n), 104,08 (n), 86,45 (n), 86,22 (n), 79,73 (n), 78,56 (n), 78,22 (n), 77,70 (n), 75,93 (n), 74,93 (n), 73,60 (n), 72,62 (n), 72,13 (p), 71,54 (n), 70,95 (n), 70,65 (n), 70,36 (n), 69,37 (n), 69,23 (n), 69,07 (n), 68,33 (n), 66,82 (n), 66,70 (n), 66,26 (n), 65,84 (n), 63,55 (n), 62,50 (p), 62,17 (p), 61,63 (p), 59,74 (p), 58,08 (n), 57,09 (n), 56,75 (n), 56,51 (n), 56,09 (n), 55,62 (p), 55,46 (p), 54,87 (p), 54,76 (p), 54,27 (p), 53,30 (n), 51,87 (n), 49,86 (n), 49,62 (p), 48,09 (p), 47,99 (p), 47,43 (p), 46,76 (p), 44,93 (p), 44,84 (p), 43,02 (n), 42,13 (p), 41,20 (p), 40,96 (p), 40,67 (p), 40,44 (p), 39,24 (p), 38,37 (p), 38,28 (p), 37,01 (p), 36,24 (p), 35,91 (p), 35,82 (p), 35,42 (p), 35,00 (p), 34,79 (p), 34,46 (p), 33,92 (p), 33,69 (p), 33,48 (p), 32,41 (p), 32,30 (p), 31,91 (p), 30,82 (p), 30,68 (p), 30,42 (p), 30,06 (p), 29,89 (p), 29,78 (p), 29,72 (p), 29,48 (p), 29,30 (p), 29,13 (p), 28,32 (p), 27,84 (p), 27,47 (p), 26,98 (p), 26,72 (p), 26,28 (p), 26,14 (p), 26,05 (p), 25,64 (p), 25,39 (p), 25,11 (p), 25,03 (p), 24,40 (p), 24,26 (n), 24,06 (n), 23,73 (p), 22,96 (p), 22,73 (p), 22,24 (p), 21,88 (p), 21,22 (p), 19,53 (p), 19,13 (p), 18,04 (n), 17,81 (n), 16,77 (n), 14,26 (n). Sendo p = sinais positivos (dois ou nenhum hidrogênio ligado a carbono), n = sinais negativos (um ou três hidrogênios ligados a carbono).

Monitoramento da atividade tóxica

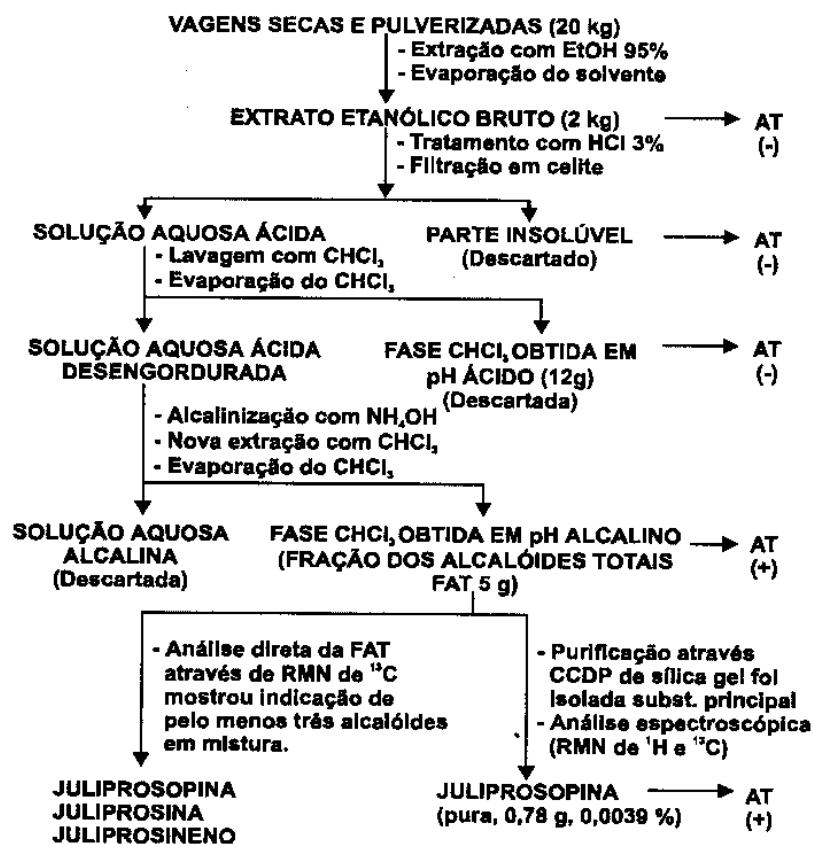
No monitoramento da atividade tóxica aguda (DL₅₀) dos extratos, frações e substância pura, foi utilizada a via intraperitoneal. Os animais, camundongos albinos machos (*Mus musculus*) pesando entre 25 a 35 g, foram divididos ao acaso em doze grupos de dez, sendo que dois foram usados como controle. As doses da FAT testadas foram: 25; 12,5; 9,26; 6,25 e 3,12 mg/kg. Para o alcalóide puro, juliprosopina, foram utilizadas as doses de 50; 25; 12,5; 10 e 1 mg/kg. Após a administração, os animais foram observados durante 48 horas segundo metodologia descrita por Almeida e colaboradores (Almeida et al., 1999). O grupo controle recebeu solução de ágar-ágar a 0,25 % mais 1 gota de cremofor que foi o veículo utilizado nas preparações das doses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO**Caracterização de juliprosopina**

A figura 1 apresenta o processo de extração, isolamento e purificação dos alcalóides de *Prosopis juliflora* e monitoramento da atividade tóxica descrito na parte experimental. A análise por cromatografia em camada delgada analítica da Fração dos Alcalóides Totais, utilizando o reagente de Dragendorff como revelador, mostrou a presença de pelo menos cinco alcalóides. Apenas um deles, foi isolado em estado puro e submetido a análise espectroscópica de RMN ¹H e ¹³C recebendo a denominação de PJ-3. Os dados espectrais deste alcalóide quando comparados com os dados espectrais dos sete alcalóides isolados anteriormente desta mesma planta (Tabela 1) descritos na literatura (Ahmad et al., 1978, 1989a, 1991; Ott-Longoni et al., 1980; Datwyler et al., 1981), foram suficientes para identificar PJ-3 como juliprosopina.

TABELA 1. Alcalóides isolados de *Prosopis juliflora*.

Alcalóide	Parte do vegetal de onde foi isolado	Referência
Julifloricina	Folhas	Ahmad et al., 1978
Julifloridina	Folhas	Ahmad et al., 1978
Juliflorinina	Folhas	Ahmad et al., 1989a
Juliprosina	Planta inteira	Datwyler et al., 1981
Juliprosina, iso	Planta inteira	Datwyler et al., 1981
Juliprosineno	Folhas	Ahmad et al., 1989a
Juliprosopina (sinônimo juliflorina)	Planta inteira	Ahmad et al., 1978; Ahmad et al., 1991 Ott-Longoni et al., 1980



AT = Atividade tóxica em camundongos, (+) = positivo, (-) = negativo

FIGURA 1. Marcha sistemática para extração, isolamento e purificação dos alcalóides de *Prosopis juliflora* e monitoramento da atividade tóxica.

Na Tabela 2 são apresentados os deslocamentos químicos dos carbonos da juliprosopina isolada de *Prosopis juliflora* cultivada na Índia comparados com os da amostra da Paraíba. Pode-se observar a concordância nas absorções dos carbonos de toda a molécula, principalmente do anel piperidínico, o que constitui um forte indício para atribuição da mesma estereoquímica dos grupos metilas e hidroxilas, em *beta*, ligados nas posições C-2,2',3,3'. Caso esses grupos estivessem em posição *alfa*, estariam absorvendo em campo mais alto como mostra o isômero juliflorinina (Ahmad et al., 1989a) (Figura 2).

TABELA 2. Dados de RMN da ^{13}C da juliprosopina isolada de *Prosopis juliflora* da Índia (Ott-Longoni et al., 1980*) e da amostra cultivada em Patos/PB.**

CARBONO	JULIPROSOPINA	
	Dados da literatura (Solvente CDCl_3) *	Dados experimentais (Solvente $\text{C}_2\text{D}_2\text{N}$) **
2,2'	57.2	57.7
3,3'	67.8	67.5
4,4'	32.2	33.1
5,5'	26.2	27.2
6,6'	55.7	56.7
7,7'	18.7	19.0
1'',1''''	37.1	37.2
2'',2''''	25.8	26.4
3''' - 8'''	30.0 - 29.4	31.0 - 30.0
9'',9''''		
10''	35.1	36.0
10'''	28.0	28.9
1''''	33.2	34.0
2''''	21.5	22.4
3''''	54.5	55.3
5''''	55.3	56.2
6''''	136.3	137.3
7''''	123.8	124.9
8''''	42.6	43.6
8a''''	65.5	66.4

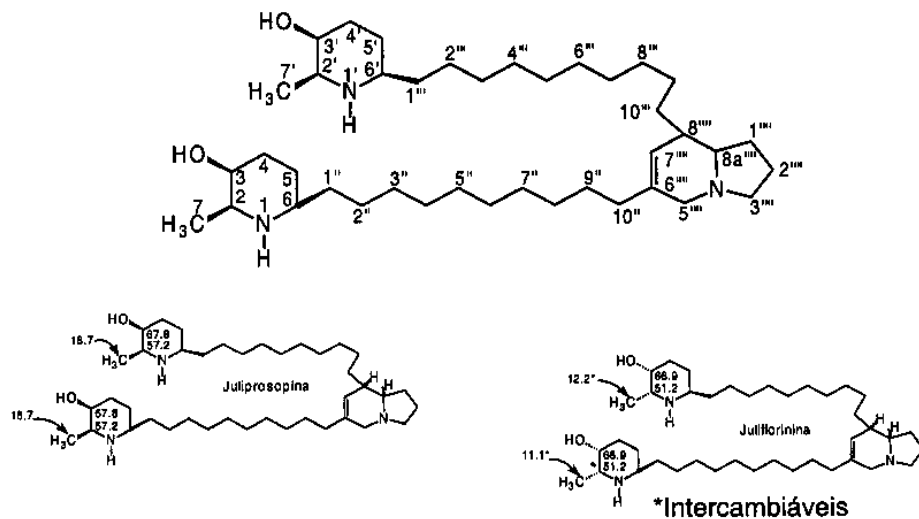


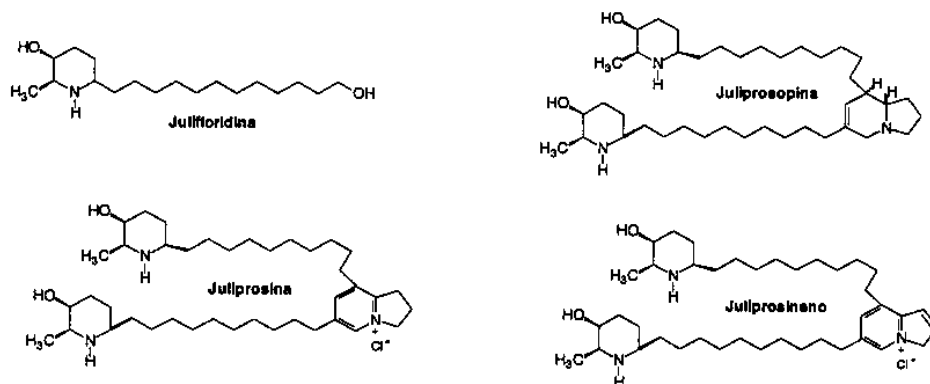
FIGURA 2. Dados da literatura que definem a estereoquímica das metilas e hidroxilas ligadas nas posições C-2,2',3,3' para juliprosopina como *beta* e juliflorina como *alfa*, baseado nos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C .

Caracterização dos outros alcalóides presentes na FAT

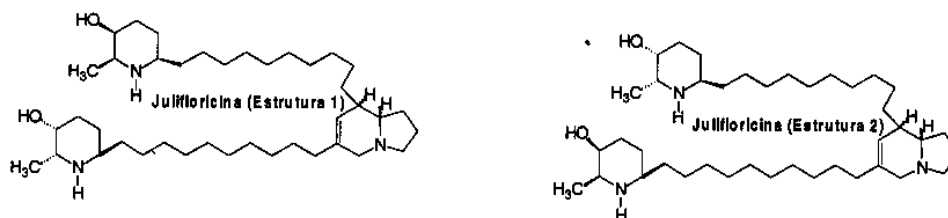
Quando vários alcalóides estão presentes em um extrato vegetal e possuem o mesmo esqueleto carbônico mas diferem apenas na estereoquímica dos seus grupos funcionais e/ou no número de duplas ligações, o fracionamento desse material por técnicas cromatográficas convencionais dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras. O que se obtém normalmente são misturas. Esta situação pode ser enfrentada de maneiras variadas dependendo do objetivo do estudo: pode-se utilizar técnicas cromatográficas especiais, se o interesse é isolar as substâncias puras, ou, se o objetivo é meramente identificá-las recorre-se a outros procedimentos. Um destes pode ser o processo cromatográfico, desde que se disponha de padrões para comparações. Um

outro que dispensa o uso de padrões é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, que requer porém uma comparação dos espectros de massas em bancos de dados espectrais via computador. Portanto, a inexistência de padrões ou a falta de bancos de dados tornaria inviável a análise de misturas de metabólitos secundários por estes métodos. Entretanto, no caso específico da planta *P. juliflora*, que já foi motivo de estudos fitoquímicos anteriores em alguns países como Paquistão e Índia (Tabela 1) a situação fica bastante simplificada, pois é possível fazer uma análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C do material em apreço, mesmo em mistura, com os dados da literatura. O espectro de RMN ^{13}C da fração de alcalóides totais de *P. juliflora* mostrou dezenas de absorções, conforme apresentado na parte experimental. A primeira observação importante é que na FAT não existe alcalóide algum com a configuração *alfa*, pois todos desta série que foram isolados anteriormente: julifloricina, juliflorinina (presente nas folhas) e isojuliprosina (presente na planta inteira) apresentam absorção das metilas C-7,7' em torno de 12 ppm e isto não foi registrado no espectro da FAT (nas vagens). Os alcalóides da série *beta*, isolados anteriormente de *P. juliflora* (juliprosopina, juliprosina e juliprosineno), apresentam na porção indolizidínica características espectrais inconfundíveis, com exceção da julifloridina que não apresenta esta porção na molécula (Figura 3). As absorções dos carbonos do anel indolizidínico dessas três substâncias também estão presentes no espectro da FAT (Figura 4). Isto permite deduzir a presença desses três alcalóides na FAT, além de outros que não puderam ser identificados.

Alcalóides da série *beta*



Alcalóides da série *alfa*



Parte da molécula pertence à série *alfa* e parte à série *beta*

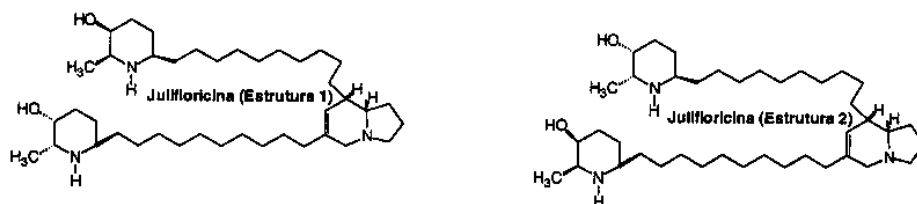


FIGURA 3. Alcalóides das séries *alfa* e *beta* isolados de *Prosopis juliflora*.

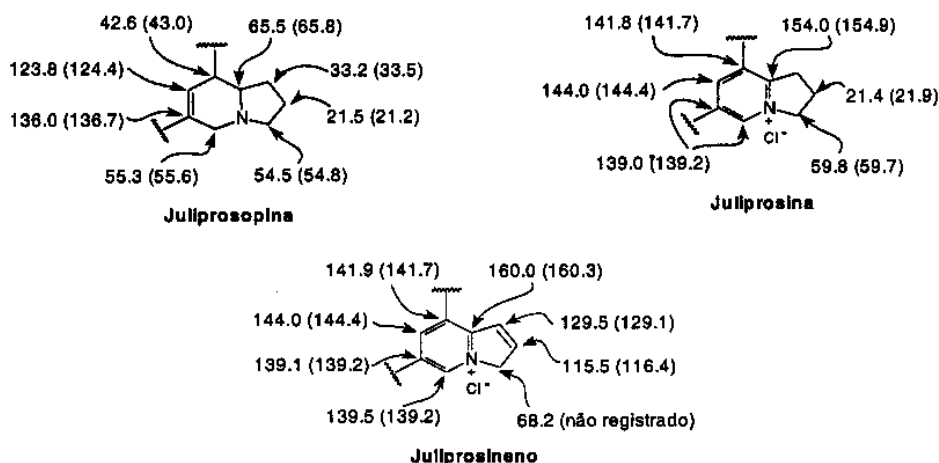


FIGURA 4. Dados de RMN ¹³C dos anéis indolizidínicos dos alcalóides da série *beta* isolados anteriormente de *Prosopis juliflora* e entre parêntesis dados registrados no espectro da FAT (Fração dos Alcalóides Totais) para essas mesmas posições.

Avaliação da atividade tóxica

Antes de discutir os resultados biomonitorados das atividades tóxicas observadas experimentalmente com *Prosopis juliflora* cultivada na Paraíba, encontra-se sumarizado na Tabela 5 o que se tem registrado na literatura para este mesmo vegetal. Além de apresentar positividade para atividades antiespasmódica (Dhawan et al., 1977), antitumoral (El-Merzabani et al., 1979b), diurética (Dhawan et al., 1977), hemolítica (Kandasamy et al., 1989), hipotérmica (Dhawan et al., 1977) e inibidora da tripsina (Giral et al., 1978), também foram encontrados trabalhos que relatam atividades antibacteriana (Dhawan et al., 1977; Ahmad et al., 1986, 1988; Caceres et al., 1995) e antifúngica (Dhawan et al., 1977; Ahmad et al., 1989b) de extratos e alcalóides.

No processo de isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Prosopis juliflora* cultivada na Paraíba o experimento para avaliar a toxicidade aguda ou dose letal 50 % (DL₅₀) foi realizado segundo o método de Litchfield & Wilcoxon (Litchfield e Wilcoxon, 1949) utilizando camundongos albinos Swiss. A via de administração foi a intraperitoneal (i.p.) onde doses crescentes dos extratos, frações e substância pura isolada foram administradas e a mortalidade verificada até 48 horas após. As doses testadas e os resultados obtidos estão sumarizados nas Tabelas 3 e 4. Para cada dose foi utilizado um grupo de 10 animais.

O Extrato Etanólico Bruto (EEB) mostrou-se desprovido de efeitos tóxicos, pois não causou a morte dos camundongos nem mostrou mudança de comportamento significativo quando administrado até a concentração de 1000 mg/kg de peso por via oral e 500 mg/kg por via i.p. Isto pode ser explicado pela baixa concentração das substâncias ativas tóxicas presentes nas vagens. Este fato talvez possa justificar os motivos que levam os bovinos a desenvolverem a doença chamada "Cara Torta" somente após um longo período, entre 8 a 10 meses, quando alimentados com uma ração desbalanceada constituída quase que exclusivamente à base de vagens de algarobeira.

A Fração dos Alcalóides Totais (FAT) na dose de 25 mg/kg de peso provocou a mortalidade de 100 % dos camundongos, DL₅₀ = 10,3 (7,9 – 12,7) mg/kg, mostrando que nesta fração estão agrupadas as substâncias responsáveis pela atividade tóxica. Dessa fração foi isolada a juliprosopina pura que mostrou uma DL₅₀ = 20,8 (19,6 – 22,0) mg/kg de peso, ou seja, 2 vezes menos ativa que a fração de onde foi obtida, sugerindo que a atividade tóxica pode ser devido a um sinergismo, ou seja, várias substâncias de natureza alcaloídica e não exclusivamente a uma única substância; por outro lado, também não se pode descartar a possibilidade de que os alcalóides minoritários, com efeitos mais intensos, sejam responsáveis por tais efeitos tóxicos.

TABELA 3. Toxicidade aguda (DL_{50}) da Fração dos Alcalóides Totais (FAT) em camundongos, observada até 48 horas após administração da fração.

DL_{50} (i.p.) (mg/kg) (Limite de confiança)	Dose (mg/kg)	Efeitos observados nos animais
10,3 (7,9 - 12,7)	25,00	Contorções abdominais, irritabilidade, hiperatividade, espasmos e mortes
	12,50	Contorções abdominais, irritabilidade, hiperatividade, espasmos e mortes
	9,26	Contorções abdominais, irritabilidade, hiperatividade, espasmos e mortes
	6,25	Contorções abdominais, irritabilidade, espasmos e ptose
	3,12	Contorções abdominais e ptose

TABELA 4. Toxicidade aguda da juliprosopina em camundongos, observada até 48 h após administração do alcalóide.

DL_{50} (i.p.) (mg/kg) (Limite de confiança)	Dose (mg/kg)	Efeitos observados nos animais
DL_{50} : 20,8 (19,6 - 22,0)	50,00	Contorções abdominais, irritabilidade, espasmos e mortes
	25,00	Contorções abdominais, irritabilidade, espasmos e mortes
	12,50	Contorções abdominais, irritabilidade, espasmos e mortes
	10,00	Contorções abdominais
	1,00	Contorções abdominais

TABELA 5. Atividades farmacológicas relacionadas para extratos de *Prosopis juliflora*, já descritas na literatura.

Atividade farmacológica	Parte do vegetal utilizado	Tipo de extrato ensaiado	Animal/Órgão/Meio	Via de administração	Dose (mg/kg)	País	Resultado	Referência
Abortiva	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	oral	200	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Analgésica	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	i.p.	375	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Anticonvulsivante	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	i.p.	375	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Antiespasmódica	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Íleo de cobaia	/	/	Índia	(+)	Dhawan et al., 1977
Antiinflamatória	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Rato	oral	375	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Antimimética	Vagens	EtOH 70%	Camundongo	i.p.	/	Egito	(-)	El-Merzabani et al., 1979a
Antitumoral	Vagens	EtOH 70%	Camundongo	i.p.	/	Egito	(+)	El-Merzabani et al., 1979b
Citotóxica	Vagens	EtOH 70%	Cultura de célula	/	/	Egito	(-)	El-Merzabani et al., 1979b
Diurética	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Rato	i.p.	187	Índia	(+)	Dhawan et al., 1977
Espermicida	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Rato	/	/	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Hemaglutinina	Vagens	Aquoso	Vaca e Humano	/	/	México	(-)	Giral et al., 1978
Hemolítica	Folhas	Fração Alcalóide	/	/	50	Índia	(+)	Kandasamy et al., 1989
Hipoglicêmica	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Rato	oral	250	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Hipotérmica	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	i.p.	375	Índia	(+)	Dhawan et al., 1977
Inibição da tripsina	Vagens	Aquoso	/	/	/	México	(+)	Giral et al., 1978
Potencialização do tempo de sono	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	i.p.	375	Índia	(-)	Dhawan et al., 1977
Toxicidade (DL ₅₀)	Partes Aéreas	EtOH-H ₂ O (1:1)	Camundongo	i.p.	750	Índia	/	Dhawan et al., 1977

/ = Não Informado; (+) = Resultado positivo; (-) = Resultado Negativo; i.p. = intraperitoneal

CONCLUSÕES

Com base nos dados experimentais obtidos e informações complementares da literatura é possível concluir que:

1. O processo de biomonitoramento utilizado no isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Prosopis juliflora* permitiu a detecção das substâncias responsáveis pela atividade tóxica aguda.
2. Através da análise espectroscópica de RMN ¹³C foi possível identificar três alcalóides de núcleo piperidínico: juliprosopina como o principal, além de juliprosina e juliprosineno.
3. A Fração dos Alcalóides Totais (FAT) apresentou maior efeito tóxico em camundongos (DL₅₀ = 10,3 mg/kg de peso) do que o alcalóide puro isolado juliprosopina (DL₅₀ = 20,8 mg/kg de peso), sugerindo que a atividade tóxica pode ser devido a ação de vários alcalóides que potencializam, a atividade e não exclusivamente a uma única substância.

A realização deste trabalho foi muito importante porque é a primeira vez que se procura relacionar, mesmo que indiretamente, a atividade tóxica presente nas vagens da algarobeira com os alcalóides piperidínicos isolados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e PRONEX pela Bolsa e suporte financeiro. Ao Banco de Dados NAPRALERT da Universidade de Illinois, Chicago, EUA, pelo levantamento bibliográfico do gênero *Prosopis*. A Raimundo Nonato da Silva Filho pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, V.U.; BASHA, A.; HAQUE, W. New alkaloids from *Prosopis juliflora*. **Z. Naturforsch. Ser. B**, 33: 347-348, 1978.
- AHMAD, A.; KHAN, K.A.; AHMAD, V.U.; QAZI, S. Antibacterial activity of juliflorine isolated from *Prosopis juliflora*. **Planta Med.**, 285-289, 1986.
- AHMAD, A.; KHAN, K.A.; AHMAD, V.U.; QAZI, S. Antibacterial activity of an alkaloidal fraction of *Prosopis juliflora*. **Fitoterapia**, 59(6): 481-484, 1988.
- AHMAD, V.U.; SULTANA, A. A terpenoid diketone from the leaves of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, 28(1): 278-279, 1989.
- AHMAD, V.U.; SULTANA, A.; QAZI, S. Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*. **J. Nat. Prod.**, 52(3): 497-501, 1989a.
- AHMAD, A.; KHURSHEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antifungal activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**, 60(1): 86-89, 1989b.
- AHMAD, A.; ALI-KHAN, K.; AHMAD, V.U. Study on pharmacokinetics of juliflorine in rabbits and chick embryonated eggs. **Pak. J. Pharmacol.**, 8(1): 1-7, 1991.
- ALMEIDA, R.N.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Rev. Bras. Farmácia**, 80(3/4): 72-76, 1999.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, D.F.; XAVIER-FILHO, L. Triagem fitoquímica de plantas medicinais do Estado da Paraíba. **Boletim da Sociedade Broteriana de Portugal**, 62: 1-9, 1984.
- CACERES, A.; MENEDEZ, H.; COHOBON, E.; SAMAYAO, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **J. Ethnopharmacol.**, 48(2): 85-88, 1995.
- CARMAN, N.J.; DOSSAJI, S.F.; MABRY, T.J. A populational survey of amino acids in *Prosopis* species from North and South America. **Biochem. Syst. Ecol.**, 2: 73, 1974.
- DANTAS, J.R.F.; MENEZES, R. Estudos experimentais de possíveis efeitos tóxicos de *Prosopis* sp "Algaroba" em bovinos. **Boletim Informativo CRMV/PB** – jan/fev – 1994.

- DATWYLER, P.; OTT-LONGONI, R.; SCHOPP, E.; HESSE, M. Juliprosine, a further alkaloid isolated from *Prosopis juliflora* A.DC. **Helv. Chem. Acta**, 64(6): 1959-1963, 1981.
- DHAWAN, B.N.; PATNAIK, G.K.; RASTOGI, R.P.; SINGH, K.K.; TANDON, J.S. Screening of Indian plants for biological activity. VI. **Indian J. Exp. Biol.**, 15: 208-219, 1977.
- EBEID, M.M. Isolation and characterization of a cholinesterase from mesquite (*Prosopis juliflora*) seedlings. **Fitoterapia**, 54(4): 179-181, 1983.
- EL-MERZABANI, M.M.; EL-AASER, A.A.; EL-DUWEINI, A.K.; EL-MASRY, A.M. A bioassay of antimutagenic alkaloids of *Catharanthus roseus*. **Planta Med.**, 36: 87-90, 1979a.
- EL-MERZABANI, M.M.; EL-AASER, A.A.; ATTIA, M.A.; EL-DUWEINI, A.K.; GHAZAL, A.M. Screening system for Egyptian plants with potential anti-tumor activity. **Planta Med.**, 36: 150-155, 1979b.
- EL-SAKHAWY, F.S.; FATHY, M.M.; SHEHATA, A.H.; SOLIMAN, F.M. Phytochemical investigation of *Prosopis juliflora* D.C. growing in Egypt. Part I. Lipids, free sugars and mucilage. **Egypt J. Pharm. Sci.**, 32(1/2): 283-293, 1991.
- GIRAL, F.; SOTELO, A.; LUCAS, B.; DE-LA-VEJA, A. Chemical composition and toxic factors content in fifteen Leguminosae seeds. **Q. J. Crude Drug Res.**, 16: 143-144, 1978.
- KANDASAMY, A.; WILLIAM, S.; GOVINDASAMY, S. Hemolytic effect of *Prosopis juliflora* alkaloids. **Curr. Sci.**, 58(3): 142-144, 1989.
- LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 96: 99-113, 1949.
- MALHOTRA, S.; MISRA, K. An ellagic acid glycoside from the pods of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, 20: 860-861, 1981a.
- MALHOTRA, S.; MISRA, K. 3,3'-Di-O-methylellagic acid 4-O-rhamnoside from the roots of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, 20: 2043-2044, 1981b.
- MALHOTRA, S.; MISRA, K. New flavanones from *Prosopis juliflora* roots. **Planta Med.**, 47(1): 46-48, 1983a.
- MALHOTRA, S.; MISRA, K. Polyphenols from *Prosopis juliflora* pods. **Indian J. Chem.**, 22B(9): 936-938, 1983b.
- MALHOTRA, S.; MISRA, K. A novel tannin from *Prosopis juliflora* roots. **Curr. Sci.**, 52(12): 583-585, 1983c.
- MENDES, B.V. **Alternativas tecnológicas para a agropecuária do Semi-Árido**. 2.ed., João Pessoa: Nobel, 1985.
- OTT-LONGONI, R.; VISWANATHAN, N.; HESSE, M. The structure of the alkaloid juliprosopine from *Prosopis juliflora* A. DC. **Helv. Chem. Acta**, 63(7): 2119-2129, 1980.
- SHUKLA, R.; TRIVEDI, K.K.; MISRA, K. New leucoanthocyanins from *Prosopis juliflora* bark. **Planta Med. (Suppl.)**, 40: 48-51, 1980.
- SHUKLA, R.V.N.; MISRA, K. Two flavonoids glycosides from the bark of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, 20: 339-340, 1981.
- SILVA, S. A algarobeira (*Prosopis juliflora*) no Nordeste do Brasil. **Secretaria de Produção Animal**, Brasília: SNAP/SPA, 1989.
- SMITH, T.A. Tryptamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, 16: 171-175, 1977.
- TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.; GRAÇA, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods (Mesquite beans). **Vet. Hum. Toxicol.**, 42(3): 155-158, 2000.
- VAJPEYI, R.; MISRA, K. Chemical constituents of *Prosopis juliflora* bark. **Indian J. Chem.** 20B(4): 348-350, 1981.

Autor para correspondência:

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal da Paraíba - Caixa Postal 5009
58051-970 - João Pessoa - PB
E-mail: jbarbosa@lff.ufpb.br